

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УО «ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

# **ДОСТИЖЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ, КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ И ФАРМАЦИИ**

Материалы 70-ой научной сессии сотрудников университета

28-29 января 2015 года

УДК 616+615.1+378  
ББК 5Я431+52.82я431  
Д 70

**Редактор:**

Профессор, доктор медицинских наук В.П. Дейкало

**Заместитель редактора:**

доцент, кандидат медицинских наук С.А. Сушков

**Редакционный совет:**

Профессор В.Я. Бекиш, профессор Г.Н. Бузук, профессор С.Н. Занько,  
профессор В.И. Козловский, профессор Н.Ю. Коневалова,  
д.п.н. З.С. Кунцевич, д.м.н. Л.М. Немцов, профессор В.П. Подпалов,  
профессор М.Г. Сачек, профессор В.М. Семенов,  
доцент Ю.В. Алексеенко, доцент С.А. Кабанова,  
доцент Л.Е. Криштопов, доцент С.П. Кулик,  
доцент Т.Л. Оленская, профессор А.Н. Щапакова, д.м.н. А.В. Фомин.

ISBN 978-985-466-695-2

Представленные в рецензируемом сборнике материалы посвящены проблемам биологии, медицины, фармации, организации здравоохранения, а также вопросам социально-гуманитарных наук, физической культуры и высшей школы. Включены статьи ведущих и молодых ученых ВГМУ и специалистов практического здравоохранения.

УДК 616+615.1+378  
ББК 5Я431+52.82я431

ISBN 978-985-466-695-2

© УО “Витебский государственный  
медицинский университет”, 2015

# МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК В БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

*Генералов И.И., Коротина О.Л., Сенькович С.А., Дворецкий Е.О.,  
Жерулик С.В., Волкова М.В., Лептеева Т.Н.*

*УО «Витебский государственный медицинский университет»*

**Актуальность.** Распад тканей различного происхождения (инфекционное и неинфекционное воспаление, травма, ишемия и некроз, канцерогенез) сопровождается высвобождением клеточной ДНК из поврежденных ядер. Тем самым по уровню свободной ДНК можно оценить глубину цитолиза и степень повреждения тканей, что может быть использовано для лабораторной диагностики самых различных состояний (инфаркта миокарда, инфекционного и неинфекционного артрита, чувствительности опухоли к химио- и радиотерапии и т.д.)

В свою очередь, для определения ДНК в настоящее время предлагается обширный набор методов, основанных на взаимодействии ДНК с флюоресцентными специфическими красителями.

Для выявления комплексов «ДНК-краситель» применяют прямую флуориметрию реакционной смеси, включая ПЦР-анализ в режиме реального времени, капиллярный электрофорез, гель-электрофорез, обращенно-фазовую ВЭЖХ и т.д. Однако все вышеперечисленные методы требуют дорогостоящего оборудования, вследствие чего в практике клинко-диагностических лабораторий они применяются достаточно редко.

Кроме того, современные диагностические тесты должны удовлетворять условиям экспресс-анализа с возможностью их выполнения в условиях непосредственной работы с пациентом (так называемые «on-chair», «on-bed» или «point-of-care» tests, а также лабораторные тесты в условиях проведения оперативных вмешательств). Ранее нами был предложен метод полуколичественного экспресс-определения ДНК в реакции с бромидом этидия и регистрацией результатов с помощью трансиллюминатора UVT-1 [1].

**Целью исследования** стало усовершенствование флуоресцентного экспресс-метода определения ДНК в биологических материалах с применением различных флюоресцентных красителей и возможностью полуколичественного или количественного учета реакции.

**Материал и методы.** В качестве флюорохромов для взаимодействия с ДНК использовали флюоресцентные красители этидия бромид, пропидия йодид, DAPI и PicoGreen. В основных экспериментах применили флюорохромы DAPI и PicoGreen (производства Invitrogen, США) с учетом высокой чувствительности и воспроизводимости их взаимодействия с ДНК.

Основную реакцию проводили в 96-луночном полистироловом планшете. Растворы ДНК в различных концентрациях (от 40 до 7500 нг/мл) и соответствующие флюоресцентные красители (DAPI и PicoGreen) смешивались в конечном объеме 0,2 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера (ФБР) pH 7,4 непосредственно перед визуализацией. При использовании красителя DAPI результаты регистрировали с помощью трансиллюминатора UVT-1, оснащенного источниками УФО-излучения с максимумом 312 нм. В случае применения флюорохрома

PicoGreen возбуждение флюоресценции выполняли с помощью светодиодной панели, включающей 8 синих светодиодов с узкополосным излучением (465-470 нм).

Цифровое изображение результатов реакции получали с помощью камеры Canon G10 при съемке через оранжевый светофильтр. Полученные цифровые снимки калибровочных кривых обрабатывали программой ImageJ (NIH, США). Этапы обработки включали получение 8-битного изображения в градациях серого цвета и выделение в изображении областей интереса, соответствующих середине лунок планшета, содержащих комплекс «ДНК-флюорохром». На последнем этапе подключали плагин анализа с построением графика изменения яркости лунок (от 0 до 255) в зависимости от концентрации ДНК.

В качестве метода сравнения использовали флуориметрию с оценкой результатов на спектрофлуориметре CM 2203 производства ЗАО «Солар», Республика Беларусь. Для построения калибровочной кривой использовали краситель PicoGreen. К 2 мл раствора ДНК в концентрации от 100 пг/мл до 10 мкг/мл в 0,01 М натрий-фосфатном буфере (ФБР) pH 7,4 добавляли 50 мкл раствора PicoGreen, инкубировали в течение 5 минут и проводили флуориметрию (длина волны возбуждения – 480 нм, флюоресценции – 520 нм).

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с использованием пакетов прикладных статистических программ. Калибровочные кривые для разработанных методов получали при помощи регрессионного анализа; для оценки воспроизводимости рассчитывали коэффициент вариации методов.

**Результаты и обсуждение.** При сравнении калибровочных кривых, полученных как базовым методом спектрофлуориметрии на приборе «Солар», так и методом количественного анализа изображений в программе ImageJ оказалось, что они полностью совпадают. В обоих случаях зависимость между концентрацией ДНК в пробах и величиной флюоресцентного сигнала описывалась уравнением вида  $Y=a+b \cdot X^{1/2}$  с коэффициентом детерминации  $R^2>0,98-0,99$  при  $p<0,001$ . Это подтверждает взаимную эквивалентность использованных методов.

При этом разработанный нами количественный способ не требует применения дорогостоящего высокоспециализированного оборудования (спектрофлуориметра), позволяет одновременно тестировать десятки образцов (при дублированном определении – не менее 30-40) с уменьшением объема реакционной смеси в сравнении с базовым прототипом не менее чем в 5-10 раз.

Диапазона яркостной шкалы (0-255) оказалось достаточно для количественной характеристики содержания ДНК по крайней мере в границах концентраций от 40 до 6400 нг/мл. Коэффициент вариации контрольных проб внутри одного опре-

деления оказался менее 5%, а опытных проб (при концентрации ДНК 100 нг/мл) – менее 7%, что свидетельствует о хорошей воспроизводимости предлагаемой методики.

С помощью разработанного нами способа была проведена начальная экспресс-оценка содержания ДНК в различных многокомпонентных биологических средах (сыворотка, суставная жидкость, микробная биопленка). Предварительные результаты подтверждают возможность использования данного метода для решения подобных задач.

**Выводы.** Разработана планшетная микромодификация флуоресцентного метода определения

ДНК с возможностью количественного учета результатов исследования методом анализа изображений. При этом методика учета реакции не требует специализированного флуориметрического оборудования.

#### Литература

1. ЁКоротина, О.Л. Определение концентрации ДНК как маркера локального воспалительного процесса / О.Л. Коротина, А.Ф. Марцинкевич // До-стижения фундам., клин. медицины и фармации : материалы 68 науч. сессии сотрудников ВГМУ, Витебск, 31 янв.–1 февр. 2013 г. 2013 г. – С. 347–49.

## ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ В ТОНКОМ ОТДЕЛЕ КИШЕЧНИКА КРЫС ПРИ ПОЛУПРИНУДИТЕЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

*Гидранович Л.Г., Ходос О.А., Гидранович В.И.*

*УО «Витебский государственный медицинский университет»*

**Актуальность.** Хроническая алкогольная интоксикация вызывает серьезные функциональные и патологические отклонения во многих органах, особенно в сердце, печени, легких, головном мозге. Биотрансформация экзогенного этанола начинается в клетках слизистой оболочки рта и протекает во многих органах и тканях. Первый этап превращения этанола заключается в окислении этанола до этанала с помощью NAD-зависимого цинксодержащего фермента алкогольдегидрогеназы, второй этап – окисление этанола до ацетата – осуществляется при участии NAD-зависимой альдегиддегидрогеназы. Далее фермент ацетил-CoA-синтетаза при участии АТФ и CoASH катализирует превращение ацетата в ацетил-CoA, последний может поступать в цикл трикарбоновых кислот либо принимать участие в синтезе жирных кислот, холестерина и стероидных гормонов. В процессе биотрансформации этанола используется окисленный NAD<sup>+</sup>, с образованием восстановленного NAD-H, что приводит к нарушению соотношения коферментов окислительно-восстановительных ферментов дегидрогеназ. Дефицит NAD<sup>+</sup> сопровождается замедлением гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и  $\beta$ -окисления высших жирных кислот.

Хроническая алкогольная интоксикация ведет к понижению скорости второго этапа биотрансформации этанола – окисления этанала до ацетата. Этаналь нарушает функции печени, приводит к накоплению в крови жирных кислот, глицерина, пирувата и лактата, что сопровождается развитием метаболического ацидоза. Хроническое повреждение печени оказывает влияние на обмен углеводов. При длительном потреблении этанола наблюдается угнетение процессов глюконеогенеза, запасы гликогена истощаются, наблюдается гипогликемия [1].

Ферменты глюконеогенеза сосредоточены преимущественно в печени и почках, причем вклад последних в синтез глюкозы в 10 раз меньше из-за небольших размеров этих органов. Кроме того, глюконеогенез протекает в тонком отделе кишечника. Глюкоза синтезируется из пирувата с образованием тех же промежуточных продуктов, что и при глико-

лизе. Однако, среди реакций гликолиза существуют три термодинамически необратимых этапа, которые катализируются ферментами пируваткиназой, фосфофруктокиназой и гексокиназой. Чтобы обойти эти три необратимых этапа гликолиза, в глюконеогенез включаются четыре фермента, не принимающие участие в гликолизе: пируваткарбоксилаза, фосфоенолпируваткарбоксикиназа, фруктозо-1,6-бисфосфатаза (Ф-1,6-бис-Ф-аза) и глюкозо-6-фосфатаза (Г-6-Ф-аза). В связи с вышеизложенным, изучение активности ферментов глюконеогенеза при хроническом потреблении этанола является актуальным для выяснения молекулярных механизмов его токсического действия.

**Цель.** Изучить активность ферментов, катализирующих два необратимых этапа глюконеогенеза: фруктозо-1,6-бисфосфатазы (D-фруктозо-1,6-бисфосфат 1-фосфогидролаза, КФ 3.1.3.11) и глюкозо-6-фосфатазы (D-глюкозо-6-фосфат фосфогидролаза, КФ 3.1.3.9), а также активность фермента одного обратимого этапа – глюкозофосфат-изомеразы (ГФИ) (D-глюкозо-6-фосфат кетол-изомераза, КФ 5.3.1.9) в тонком отделе кишечника крыс при полупринудительной хронической алкогольной интоксикации.

**Материал и методы.** Опыты проводили на самцах крыс линии Wistar массой тела 250-300 грамм, содержащихся на нормированном рационе в условиях вивария. Животным опытной группы в течение 4 месяцев спаивали через поилки 30% раствор этанола вместо воды. Животные контрольной группы получали дистиллированную воду. Забой животных проводили сразу после последнего потребления этанола (группа 1) и через 24 часа после отмены этанола (группа 2). Концентрацию этанола в крови определяли на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором. Кишечник извлекали, промывали физраствором и гомогенизировали в 0,05М трис-HCl-буфере pH 7,4 в соотношении ткани к буферу 1:50. Активность Г-6-Ф-азы и Ф-1,6-бис-Ф-азы определяли по интенсивности отщепления неорганического фосфата от глюкозо-6-фосфата и фруктозо-1,6-бисфосфата, соответственно. Кон-